

实验感染的三带喙库蚊和来亨鸡体内 西尼罗病毒的分离与鉴定

姜淑芳, 赵彤言*, 董言德, 郭晓霞, 张映梅, 李春晓, 张晓龙, 邢 丹

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要: 采用 C6/36 细胞培养分离活病毒、间接免疫荧光染色检测病毒抗原、RT-PCR 扩增病毒基因片段和 PCR 产物测序等方法, 对实验感染的三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 和来亨鸡血液样本中的西尼罗病毒进行分离和鉴定。结果表明, 接种实验感染蚊虫研磨液和来亨鸡血液样本的 C6/36 细胞出现细胞融合、空泡形成的病变效应; 用西尼罗病毒抗血清进行间接免疫荧光染色, 感染病毒的细胞呈现黄绿色荧光, 为阳性反应; 采用 3 对不同引物的 RT-PCR 体系扩增分别出现预期的 408 bp、498 bp 和 559 bp 的基因片段, 序列测定证实扩增序列与实验所用毒株相应的基因序列基本相同。从而证实实验感染三带喙库蚊和来亨鸡体血液内的西尼罗病毒与实验感染所用的西尼罗病毒 Chin-01 株一致。

关键词: 三带喙库蚊; 来亨鸡; 西尼罗病毒; 分离; 鉴定

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)04-0588-05

Isolation and identification of West Nile virus from experimentally infected *Culex tritaeniorhynchus* and Leghorn chicken

JIANG Shu-Fang, ZHAO Tong-Yan*, DONG Yan-De, GUO Xiao-Xia, ZHANG Ying-Mei, LI Chun-Xiao, ZHANG Xiao-Long, XING Dan (State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract: C6/36 culture isolation test, indirect immunofluorescence assay, and reverse transcription PCR and sequencing of the PCR products were carried out to isolate and identify the West Nile virus (WNV) from experimentally infected *Culex tritaeniorhynchus* and Leghorn chicken. The cell pathological effects such as cell fusion and cavitation were observed in C6/36 inoculated experimentally infected samples. The antigen of WNV was detected by indirect immunofluorescence assay. Three specific PCR bands with expected size (408 bp, 498 bp, and 559 bp, respectively) were found, and the sequences of these PCR products were concordant with those of WNV Chin-01 strain. Hence, it was confirmed that the WNV from experimentally infected *Cx. tritaeniorhynchus* and Leghorn chicken was same as WNV Chin-01 strain used in our experiments.

Key words: *Culex tritaeniorhynchus*; Leghorn chicken; West Nile virus; isolation; identification

近几年来, 西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV) 的流行区域不断扩大, 在人群中爆发的频率急剧增加, 同时伴有野生鸟类的大量死亡 (Petersen and Roehrig, 2001)。西尼罗病毒 1999 年在美国纽约首次爆发, 随后迅速蔓延, 至 2004 年美国已有感染病例 16 706 之多, 死亡 666 例 (Hayes *et al.*, 2005), 西尼罗病毒病成为全球普遍关注的新发传染病之一。研究已证明, 鸟类是该病毒的保存宿主, 带病毒的候鸟迁徙是

其远距离扩散的重要途径 (Rappole *et al.*, 2000), 蚊虫是其主要的传播媒介。能够自然感染或实验感染、传播西尼罗病毒的蚊虫媒介涉及范围甚广, 包括库蚊 *Culex*、伊蚊 *Aedes*、轱蚊 *Coquillettidia*、按蚊 *Anopheles*、骚扰蚊属 *Ochlerotatus* 等共 11 个属 70 多种蚊虫 (Higgs *et al.*, 2004), 其中库蚊是最主要的媒介。虽然有些蚊虫在病毒传播过程中的作用尚不清楚, 但是研究已证明, 不同地区的主要媒介各不相

基金项目: 国家科技部攻关项目 (2003BA712A09-02); 国家自然科学基金资助项目 (30371256)

作者简介: 姜淑芳, 女, 1965 年 1 月生, 博士, 研究方向为病原生物学, E-mail: jsf0912@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zhaoty@nic.bmi.ac.cn

收稿日期 Received: 2005-12-29; 接受日期 Accepted: 2006-05-09

同,同一种蚊虫不同的地理株对于西尼罗病毒的易感性及传播作用也有所不同(Hayes, 1984)。

在我国有许多候鸟的栖息繁殖地,存在着许多病媒蚊虫种群,部分地区的人群和鸟类血清中存在 WNV 抗体(陈伯权等, 1983; 杨起饶等, 1988), 说明在一定程度上有 WNV 爆发流行的可能。三带喙库蚊 *Cx. tritaeniorhynchus* 是我国乙型脑炎病毒的主要传播媒介, 西尼罗病毒与乙型脑炎病毒同属于一个抗原组, 并且, 国外研究证实在中东三带喙库蚊是 WNV 的重要传播媒介(Hayes, 1984; Higgs *et al.*, 2004)。因此, 选择三带喙库蚊等重要的蚊虫进行经口感染和传播 WNV 的实验研究, 对于提出我国潜在的传播媒介, 在将来可能的爆发流行中, 针对媒介蚊虫进行有效防控具有重要意义。

实验感染的蚊虫和来亨鸡体内病毒的检测和鉴定是进行蚊虫传播 WNV 实验研究的必要手段。本研究用细胞接种分离活病毒、免疫荧光染色检测病毒抗原、RT-PCR 扩增病毒不同基因片段和 PCR 产物测序等方法对实验感染三带喙库蚊和来亨鸡体内的 WNV 进行分离和鉴定, 以确保感染和实验检测结果的准确和可靠。

1 材料与方法

1.1 实验动物、病毒株和细胞

KM 小鼠(*Mus musculus*, 1~3 日龄的乳鼠带母鼠)、Balb/c 小鼠(6~8 周龄, 雌性)由军事医学科学院实验动物中心提供。来亨鸡(Leghorn chicken, 1~3 日龄)购自北京实验动物中心梅里亚维通公司。三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* Giles 云南株, 由云南省流行病研究所赠送, 本研究室常规保种传代。西尼罗病毒 Chin-01 株为军事医学科学院微生物流行病研究所毒种库保存, 用 1~3 日龄的 KM 乳鼠脑内接种法进行传代。白纹伊蚊 C6/36 细胞由本所细胞库提供, 28℃, 5% CO₂ 培养条件下, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养液(含 10% 胎牛血清)传代培养。

1.2 主要仪器与试剂

台式冷冻离心机是 Sigma 公司产品; PCR 扩增仪(GeneAmp PCR System2400)是 PERKIN ELMER 公司产品; Trizol 和 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)是 Gibco 公司产品; RT-PCR 试剂、DNA Marker DL2000 和 DNA 纯化试剂盒是 TaKaRa 公司产品; 胎牛血清是 Hyclone 公司产品; 引物由 SBS

Genetech 公司合成; FITC 标记羊抗鼠 IgG 是中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.3 西尼罗病毒抗原的制备

参照文献(谢超等, 2002; 杨发青等, 2004)制备 60% 的西尼罗病毒 KM 乳鼠脑悬液, 经 56℃, 30 min 进行病毒灭活后 4℃, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液作为免疫用病毒抗原。

1.4 西尼罗病毒抗血清的制备

首次免疫, 将病毒抗原与弗氏完全佐剂充分混合, 采用多点注射法接种 6~8 周龄、雌性 Balb/c 小鼠 0.5 mL/只。以后每隔 7 天加强注射纯病毒抗原一次 0.5 mL/只, 共 3 次。最后一次注射 7 天后, 采取小鼠尾血, 用间接免疫荧光法(方法参照下文 1.7)进行抗体效价测定后, 收集鼠血, 分离血清, -20℃冻存储备用。

1.5 实验感染蚊虫及来亨鸡样本的处理

蚊虫实验感染、传播方法和检测样本的采集参照文献(Goddard *et al.*, 2002; Komar *et al.*, 2003; 郭晓霞等, 2004)进行。实验前将蚊虫断糖水饥饿 20~24 h, 饲喂感染血餐(20% 病毒鼠脑悬液: 新鲜鼠血液: 8% 糖水)1 h 后, 挑选饱血蚊, 常规饲养 14 天, 再次断糖水饥饿 20~24 h, 使其刺叮来亨鸡 1 h。随即将吸血蚊虫冻麻, 加蚊虫稀释液(含有胎牛血清的 DMEM)1 mL/只进行研磨, 研磨液冻存于 -70℃, 用于病毒检测。于刺叮传播实验后第二天采取来亨鸡颈静脉血液 0.1 mL/只, 加入 0.9 mL 血液稀释液(含有胎牛血清和肝素的 DMEM)中, 混匀, 冻存于 -70℃, 用于病毒检测。于接种细胞前用针式滤器(滤膜直径为 0.22 μm)将蚊虫研磨液和来亨鸡血液样本进行抽滤除菌。用饲喂不含病毒悬液血餐的三带喙库蚊研磨液作为阴性对照, 处理方法与实验样本相同。

1.6 实验样本的分离接种与细胞病变观察

在 25 cm² 的细胞培养瓶中, 常规制备 C6/36 细胞单层。接种已经抽滤过的感染蚊虫研磨液和被感染蚊虫刺叮的来亨鸡血液样本, 300 μL/瓶, 置 37℃, 5% CO₂ 孵箱中, 吸附 2.0 h, 期间轻轻摇动细胞培养瓶数次, 促进病毒吸附和侵入细胞。吸出接种液, 加入细胞维持液(DMEM, 含 5% 胎牛血清), 5.0 mL/瓶, 置 37℃, 5% CO₂ 孵箱中孵育, 每天观察细胞变化。并与接种病毒鼠脑悬液的阳性对照、接种未感染蚊虫研磨液的阴性对照细胞进行比较。

1.7 病毒抗原的间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测

接种病毒鼠脑悬液、感染蚊虫研磨液和被感染蚊刺叮的来亨鸡血液样本的 C6/36 细胞孵育 3~4 天,吸除部分细胞维持液,然后轻轻将细胞悬浮,滴加到微孔玻片上,使细胞自然沉降、干燥后,用冷丙酮固定 15 min,作为抗原片。每张微孔玻片上留 2 个孔,加接种阴性对照蚊虫研磨液和来亨鸡血液样本的细胞悬液。将自制抗血清按照效价稀释后,加入微孔中,放置湿盒内,于 37℃ 孵箱中反应 1.0 h,然后用 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)充分洗片,加用伊文氏蓝溶液稀释为工作浓度(1:40)的 FITC 标记羊抗鼠 IgG,覆盖细胞膜,放 37℃ 孵箱中反应 20 min,用 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)充分洗片,加磷酸甘油封片后,置荧光显微镜下观察。

1.8 RT-PCR 及其产物测序

分别取冻存于 -70℃ 的蚊虫研磨液和来亨鸡血液样本 150 μ l,提取总 RNA。RT-PCR 操作参照文献(Shi *et al.*, 2001; Kauffman *et al.*, 2003)和 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂说明书加以改进后进行。采用的 3 对引物分别为, P1: 5'-TTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCCT-3', P2: 5'-CAGCCGACAGCACTGGA CATTGATA-3' 扩增病毒 prM 区 232~640 bp 之间的 408 bp 片段; P9: 5'-ATGACAAACGTGCTGACCCAG-3', P10: 5'-TGGCGTGTGGTTCCTCAAAC-3' 扩增病毒 E 蛋白区的 1 211~1 708 bp 之间的 498 bp 片段; P49: 5'-ATTGCTCCGCTGTCCCTG-3', P50: 5'-TTTGTTTCAC CCAGTCCTCCTG-3' 扩增病毒 NS 区的 10 030~10 588 bp 之间的 559 bp 片段。其中, P1 和 P2 扩增体系已经过优化(另文发表),产物进行了测序,序列与实验所用 WNV Chin-01 株同源性为 100%,在此研究中作为阳性控制体系。P9/P10 和 P49/P50 的 RT 反应体系为 10 μ l,主要包括:

5 \times 反应缓冲液 2.0 μ l 4 种脱氧三磷酸核苷混合液(2.5 mmol/L each) 4.0 μ l, RNA 酶抑制剂 0.25 μ l, 反转录酶 0.5 μ l, 下游引物 0.5 μ l, H₂O 1.75 μ l, 样本 RNA 1.0 μ l。反应循环为 55℃ 30 min; 99℃ 5 min 5℃ 5 min。PCR 反应体系为 25 μ l, 包括 10 \times 反应缓冲液 2.5 μ l 4 种脱氧三磷酸核苷混合液(2.5 mmol/L each) 1.5 μ l, 热启动 Taq 酶(Ex TaqTMHS) 0.2 μ l, 上游引物 0.2 μ l, 下游引物 0.1 μ l, H₂O 19.0 μ l, 反转录产物 1.5 μ l。反应循环为 94℃, 2 min 后, 进入循环 94℃ 30 s 58℃ 或 50℃ 30 s 72℃ 1 min, 共 45 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

分别将引物 P9/P10 和 P49/P50 扩增的产物 100 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳分离, 在紫外灯照射下,

切取特异性条带, 用微量 DNA 纯化试剂盒进行纯化后, 送 TaKaRa 公司直接用下游引物测序。

2 结果与分析

2.1 西尼罗病毒抗血清的效价

抗血清经 10 倍系列稀释后, 1:80 稀释孔可见 50% 以上细胞荧光染色阳性, 因此, 抗血清效价为 80。

2.2 样本的分离接种与细胞病变观察

孵育 3~4 天后, 部分细胞出现形态改变, 表现为细胞融合, 空泡形成, 细胞病变严重时, 可全部漂起, 类似细胞衰老的表现, 但是比较而言, 接种病毒鼠脑悬液和感染样本的细胞出现形态改变时间早, 并且较多。阴性对照细胞中个别细胞也可有衰老表现, 但是出现时间较晚。

2.3 免疫荧光染色检测病毒抗原

接种病毒鼠脑悬液、感染蚊虫研磨液和被感染蚊刺叮的来亨鸡血液样本的 C6/36 细胞孵育 3~4 天后, 经荧光染色, 出现多少不一、荧光强弱不同的黄绿色荧光细胞, 为阳性; 阴性对照样本细胞均呈红色荧光, 为阴性。见图 1。

2.4 RT-PCR 及其产物测序

3 对引物分别扩增出预期的特异性区带, 阴性对照和空白对照则没有目的条带(图 2)。经分离、纯化后测序, 用 Blast 进行比对, P9/P10 和 P49/P50 扩增的基因序列与 Chin-01 同源性分别为 100% 和 99.79%。用 DNASTAR 软件对扩增序列与 Chin-01 株序列进行碱基对比, P49/P50 扩增的 559 bp 片段与 WNV Chin-01 基因序列在 10 165 bp 处相差一个碱基(A-G)。观察发现在测序图谱中, 此处显示了碱基多态性, 有 A 和 G 两个峰值, 相比较而言 A 峰值较高。

3 讨论

实验感染的蚊虫和来亨鸡血液样本中病毒的检测与鉴定, 是进行蚊虫实验感染和传播西尼罗病毒研究的必要手段。为了保证实验结果的准确和可靠, 我们采用多种方法对实验感染的三带喙库蚊和来亨鸡血液样本中的病毒进行了鉴定。

病毒分离接种法是经典的病毒检测技术, 用于分离检测活的病毒。常用的方法有两种, 乳鼠脑内接种法和细胞分离接种法。早期有关西尼罗病毒蚊

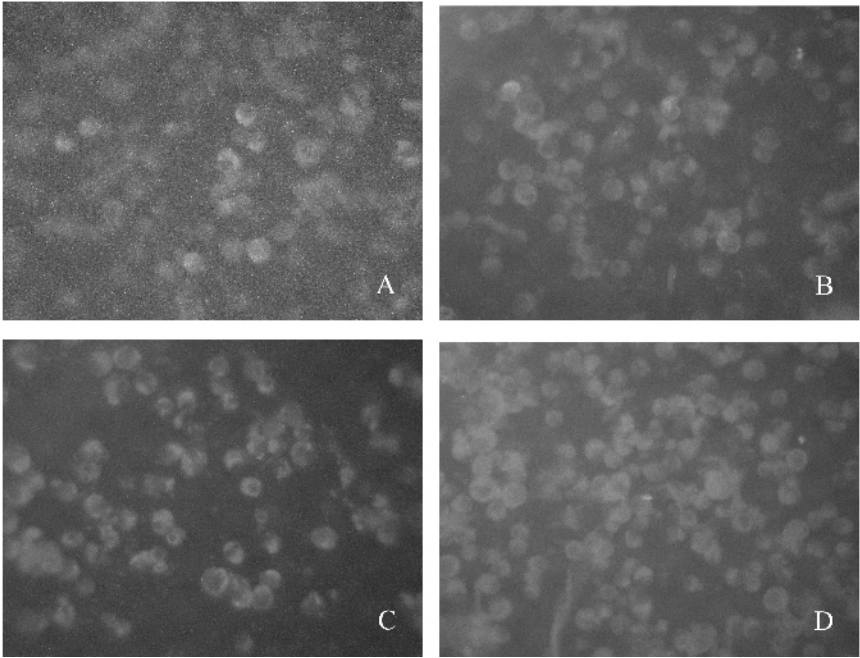


图 1 接种实验样本的 C6/36 细胞间接免疫荧光检测 (IFA) 结果 (400 ×)

Fig. 1 IFA results of C6/36 inoculated experimental samples (400 ×)

A : 接种感染蚊虫研磨液 Inoculated experimentally infected mosquito samples ; B : 接种被感染蚊刺叮的来亨鸡血液 Inoculated blood of Leghorn chicken stung by infected mosquito samples ; C : 接种病毒鼠脑悬液 Inoculated virus in infected mouse brain tissues ; D : 接种阴性对照蚊虫研磨液 Inoculated negative control mosquito.

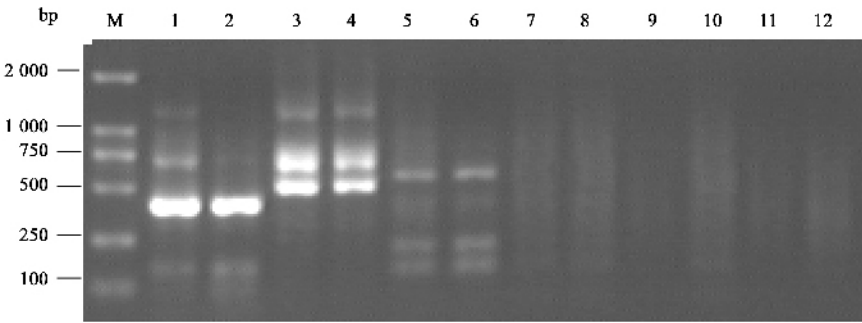


图 2 3 对引物扩增蚊虫研磨液和来亨鸡血液的 RT-PCR 结果

Fig. 2 Results of RT-PCR by 3 sets of primers

M : DNA 分子量标准 DL2000 DNA Marker ; 1 , 2 : 引物 P1/P2 扩增 408 bp 片段 408 bp product by primers P1/P2 ; 3 , 4 : 引物 P9/P10 扩增 498 bp 片段 498 bp product by primers P9/P10 ; 5 , 6 : 引物 P49/P50 扩增 559 bp 片段 559 bp product by primers P49/P50 ; 7 - 9 : 阴性对照 Negative control ; 10 - 12 : 空白对照 Blank control.

虫媒介的研究主要采用的是乳鼠脑内接种法(Hayes *et al.* , 1984)。将蚊虫研磨处理后 , 接种一定数量的乳鼠脑内 , 通过观察乳鼠是否出现散窝、弓背、震颤、抽搐、甚至死亡等症状 , 判断其是否感染。同时 , 可以根据发病鼠数量计算病毒的滴度。细胞分离接种法 , 主要用 C6/36 细胞和 Vero 细胞进行 , 由于西尼罗病毒产生的细胞病变不明显 , 难以判断 , 分离阳性率较低。无论是乳鼠脑内接种法还是细胞分离接种法 , 均操作繁琐 , 实验周期长 , 特别是出现阴性结果时 , 需要进行盲传 2 ~ 3 代 , 以排除可能由于活病毒

量少而导致的假阴性。如果进行病毒检测 , 一般该法不单独应用 , 需要配合用其他方法 , 如免疫荧光、RT-PCR 等加以证实(Nasci *et al.* , 2002 ; Tiawsirisup *et al.* , 2004 , 2005)。RT-PCR 用于病毒的检测具有快速、敏感、特异等优点 , 近几年在媒介生物学研究中具有重要的应用价值。

本研究将病毒鼠脑悬液、实验感染样本接种 C6/36 细胞单层 , 发现 WNV 能够引起细胞病变效应 , 表现为细胞融合和空泡形成。但是 , 当病毒量较少 , 出现的细胞病变效应轻微时 , 难以与阴性对照细

胞的衰老现象相鉴别,因此,需要进一步验证 (Tiawisirup *et al.*, 2005)。本研究将接种样本的细胞悬起制备抗原片后,借助免疫荧光染色方法检测 WNV 抗原,以明确实验感染蚊虫和来亨鸡血液中有无 WNV 抗原的存在。虽然有研究结果表明 (Smithburn, 1942; De Madrid and Porterfield, 1974), WNV 与其他虫媒病毒具有相同抗原性,存在免疫交叉反应,但是,本研究所用蚊虫为实验室稳定传代蚊虫,来亨鸡为清洁级实验动物,且阴性对照均未出现阳性荧光细胞,因此,认为本实验中所用蚊虫和来亨鸡体内无与 WNV 相关的抗原存在,细胞免疫荧光反应阳性者,则表明有 WNV 抗原。同时,选取 3 对引物,对病毒核酸 3 个不同的区域进行的 RT-PCR,分别扩增出预期的 408 bp、498 bp 和 559 bp 特异性区带,阴性对照和空白对照均无此扩增带。进一步进行基因序列测定结果表明, P1、P2 扩增的 408bp 片段基因序列与所用 WNV Chin-01 同源性为 100%; P9/P10 和 P49/P50 扩增的基因序列与 Chin-01 同源性分别为 100% 和 99.79%。所以,认为所扩增序列与实验感染所用的西尼罗病毒 Chin-01 株基本一致。

综上所述,本研究应用细胞接种分离活病毒、间接免疫荧光染色检测病毒抗原、RT-PCR 三种方法对实验感染的三带喙库蚊和来亨鸡体内的西尼罗的病毒进行了分离和鉴定,结果证明为实验感染所用的 WNV Chin-01 株,从而为正确评价中国重要蚊虫感染和传播西尼罗病毒的潜在能力奠定了基础。

参 考 文 献 (References)

- Chen BQ, Liu QZ, Zhou GF, 1983. A study on arboviruses antibody in human sera collected from different parts of China. *Chinese Journal of Epidemiology*, 4(5): 263–266. [陈伯权, 刘琴芝, 周国芳, 1983. 我国一些地区人清的虫媒病毒抗体调查. 中华流行病学杂志, 4(5): 263–266]
- De Madrid AT, Porterfield JS, 1974. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.* 23: 91–96.
- Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW, 2002. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(12): 1385–1391.
- Guo XX, Zhao TY, Dong YD, Jiang SN, Lu BL, 2004. Transmission of dengue-2 virus by diapausing eggs of *Aedes albopictus*. *Acta Entomologica Sinica*, 47(4): 424–428. [郭晓霞, 赵彤言, 董言德, 蒋书楠, 陆宝麟, 2004. 登革 II 型病毒经白纹伊蚊滞育卵的传递. 昆虫学报, 47(4): 424–428]
- Hayes CG, Baker RH, Baqar S, Ahmed T, 1984. Genetic variation for West Nile virus susceptibility in *Culex tritaeniorhynchus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33(4): 715–724.
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery S, O'Leary DR, Campbell GL, 2005. Epizootiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.*, 11(8): 1167–1173.
- Higgs S, Snow K, Gould EA, 2004. The potential for West Nile Virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98: 82–87.
- Kauffman EB, Jones SA, Dupuis II AP, Ngo KA, Bernard KA, Kramer LD, 2003. Virus detection protocols for West Nile Virus in vertebrate and mosquito specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 41(8): 3661–3667.
- Komar N, Langevin S, Hiten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M, 2003. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 311–322.
- Nasci RS, Komar N, Marfin AA, Ludwig GV, Kramer LD, Daniels TJ, Falco RC, Campbell SR, Brookes K, Gottfried KL, Burkhalter KL, Aspen SE, Kerst AJ, Lanciotti RS, Moore CG, 2002. Detection of West Nile virus-infected mosquitoes and seropositive juvenile birds in the vicinity of virus-positive dead birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67(5): 492–496.
- Petersen LR, Roehrig JT, 2001. West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4): 611–614.
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z, 2000. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.*, 6(4): 319–328.
- Shi PY, Kauffman EB, Ren P, Felton A, Tai JH, Dupuis AP II, Jones SA, Ngo KA, Nicholas DC, Maffei J, Elbel GD, Bernard KA, Kramer LD, 2001. High-throughput detection of West Nile virus RNA. *J. Clin. Microbiol.*, 39(4): 1264–1271.
- Smithburn KC, 1942. Differentiation of the West Nile virus from the viruses of St. Louis and Japanese B encephalitis. *J. Immunol.*, 44: 25–31.
- Tiawisirup S, Platt KB, Evans RB, Rowley WA, 2005. A comparison of West Nile virus transmission by *Ochlerotatus trivittatus* (Coq.), *Culex pipiens* (L.), and *Aedes albopictus* (Skuse). *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 5(1): 40–47.
- Tiawisirup S, Platt KB, Evans RB, Rowley WA, 2004. Susceptibility of *Ochlerotatus trivittatus* (Coq.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Culex pipiens* (L.) to West Nile Virus infection. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 4(3): 190–197.
- Xie C, Zhao TY, Yang FQ, Lu BL, 2002. An immunocytochemical study on the distribution of dengue 2 virus in *Aedes albopictus*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 18–23. [谢超, 赵彤言, 杨发青, 陆宝麟, 2002. 登革 II 型病毒在白纹伊蚊体内分布的研究. 昆虫学报, 45(1): 18–23]
- Yang QR, Liu XZ, Zhang JY, Zi DY, Zhang HL, Li XD, Zhao GF, Chen W, Cui WQ, 1988. A study on arboviruses antibodies of birds in Niao-Diao-Mountain area, Eryuan County of Yunnan Province. *Chinese Journal of Epidemiology*, 9(3): 150–153. [杨起饶, 刘行知, 张嘉玉, 自登云, 张海林, 李雪东, 赵桂芳, 陈为, 崔五全, 1988. 云南省洱源县鸟吊山鸟血清虫媒病毒抗体调查. 中华流行病学杂志, 9(3): 150–153]
- Yang FQ, Zhao TY, Xie C, Dong YD, Lu BL, 2004. Dengue type 2 virus distribution in orally infected *Aedes albopictus*. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 11(3): 157–160. [杨发青, 赵彤言, 谢超, 董言德, 陆宝麟, 2004. 登革 2 型病毒在经口感染的白纹伊蚊不同个体体内分布的研究. 寄生虫与医学昆虫学报, 11(3): 157–160]